

PAT-NO: JP402163077A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02163077 A
TITLE: CARRIER OF CELL CULTURE
PUBN-DATE: June 22, 1990

INVENTOR-INFORMATION:
NAME
KIBA, HIDEAKI
KUBOTA, HIROHISA

ASSIGNEE-INFORMATION:
NAME COUNTRY
MITSUBISHI KASEI CORP N/A

APPL-NO: JP63315518

APPL-DATE: December 14, 1988

INT-CL (IPC): C12N005/06, C12M003/00

ABSTRACT:

PURPOSE: To provide a carrier capable of culturing a cell in the same environment irrespective of change of scale of culture by coating the surface of a substrate with a water-insoluble polymer comprising a polymerizable monomer as a constituent unit and chemically bonding a functional group or protein capable of positively charging to the surface of the polymer.

CONSTITUTION: A substrate (e.g. cloth or ceramic) is impregnated with a solution comprising a polymerizable monomer (e.g. acrylic acid ester or acrylamide), a crosslinking agent, a diluent, a polymerization initiator, etc., the monomer is polymerized by heating and a water-insoluble polymer is formed to cover the surface of the substrate. In the case where the monomer

unit has
no functional group capable of positively charging, a functional
group (e.g.
amino group) or protein (e.g. collagen) capable of positively
charging is
chemically bonded to the polymer to produce a carrier for cell
culture. By
using the carrier for cell culture, culture can be effected in the
same culture
environment from culture of laboratory dish to a scale of large
amount of
culture.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

平2-163077

⑬ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)6月22日

C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

Z

8717-4B
8515-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全11頁)

⑮ 発明の名称 細胞培養担体

⑯ 特 願 昭63-315518

⑰ 出 願 昭63(1988)12月14日

⑱ 発 明 者 木 庭 秀 明 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑲ 発 明 者 久 保 田 裕 久 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑳ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉑ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞培養担体

2. 特許請求の範囲

(1) 支持体表面の少なくとも一部を重合性モノマーを構成単位とする水不溶性高分子で被覆してなり、かつ該高分子の表面には正に荷電し得る官能基又は蛋白質が化学結合していることを特徴とする細胞培養担体。

(2) 重合性モノマーが、(メタ)アクリル酸エステル又は(メタ)アクリルアミドであることを特徴とする請求項1記載の細胞培養担体。

(3) 被覆する水不溶性高分子が正に荷電し得る官能基を培養液中において、0.50～2.50 meq/gのイオン交換容量を有し、かつ支持体表面において正に荷電し得る構成モノマー単位のCLOGP値が、-2.0～+2.0の範囲にあることを特徴とする請求項1記載の細胞培養担体。

(4) 蛋白質が、コラーゲン、ゼラチン、ファイブロン、ラミニン、レクチン、フィブリン、

フィブリンノーゲン及びトロンボスポンジンからなる群から選ばれた一種又は二種以上からなることを特徴とする請求項1記載の細胞培養担体。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、細胞培養担体に関するものであり、特に細胞培養を行う際に適した細胞培養担体に関するものである。

(従来の技術)

細胞培養のための支持体として、例えばシャーレ、ガラスビン、ローラー・ボトル、スピナー・フラスコ等の容器；(メタ)アクリル酸エステルを構成単位とする重合体、デキストラン、セルロース、キチン等からなるマイクロキャリア；アルギン酸、カラギーナン、キチン、キトサン等からなるマイクロカプセル；ガラスビーズ、セラミックス等からなる固定床、その他の担体が知られている。

従来、これらの支持体に特殊なプラズマ処理を行ったり、荷電を有する化合物や蛋白質を直接

化学処理したものを細胞培養担体として用いてきた。

(発明が解決しようとする問題点)

しかし、従来の培養担体は、その表面処理方法の制約により、種々の形状のものを製造することが困難であった。それに伴って実験室段階でのシャーレ培養から大量培養スケールまでほぼ同一の培養環境で培養することが困難であった。

従って、培養の規模の変化に拘らず、同様の環境で細胞を培養できる手段が求められていた。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討を行なった結果、重合性モノマーを支持体に含浸又はコーティングした後重合することにより、種々の物質の表面を細胞培養担体とすることができることを知得し、本発明に到達するに至った。

すなわち、本発明の要旨は、支持体表面の少なくとも一部を重合性モノマーを構成単位とする水不溶性高分子で被覆してなり、かつ該高分子の表面には正に荷電し得る官能基又は蛋白質が化学

結合していることを特徴とする細胞培養担体に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の細胞培養担体において使用される支持体は、後述する重合性モノマー及び該重合性モノマーの希釈剤の溶液に対し親和性が良く、しかもこれらの溶液に対し耐薬品性であることが好ましい。更にオートクレーブ滅菌(例えば121℃、30分間)、エチレンオキシド滅菌、γ線滅菌等の滅菌処理に耐えられる素材であることが必要である。

また、かかる支持体は細胞等によって分泌された生理活性蛋白質を吸着しないか又は吸着しにくいような素材であると共に、培養期間中に素材の変形や化学的又は生物学的分解や素材成分の溶出が少ないことが望ましい。

本発明において、かかる支持体に重合性モノマーを均一に含浸させるためには、支持体は多孔性担体であることが好ましく、その好ましい細孔の大きさは、 $0.1\mu\text{m} \sim 2\text{mm}$ であり、かつ連通孔構

造であることが好ましい。

該細孔径が小さすぎる場合には、重合性モノマーは細孔内に十分に均一に浸透できず、一様な細胞付着性を付与することができない。また該細孔径が大き過ぎる場合には、十分な機械的強度が得られない場合もある。

更に付着依存性動物細胞を培養する場合、その細胞密度は一般に単位体積当りの付着表面積の値に比例するため、高密度培養を達成するためにはできる限り大きい当該値を有する支持体であることが好ましい。

また、支持体に付着した細胞を観察できるように支持体は光学的に透明な素材であることが好ましいが、これは培養のための必要条件ではない。

本発明の細胞培養担体の構造支持体として使用可能なものとしては、例えば以下のような担体を挙げることができる。

・シャーレ類、T-フラスコ類、ローラー・ボトル類、マルチトレイ類(例えば、ポリスチレン製、ポリカーボネート製、ポリエチレン製、

TPX(ポリメチルペンテン)製、ポリプロピレン製、ガラス製等)

・紙(例えば、セルロース製ろ紙、事務用紙等)

・布

・発泡性ポリウレタン(例えば、ウレタン系、エーテル系、エステル系等)

・多孔性セラミックス(例えば、シリカ製、アルミナ製等)

・金属箔、金属担体

・ガラスビース、発泡性ガラスビーズ

・シート類

・木材類

・繊維類

かかる支持体の形状や大きさは、培養方法や培養規模によって大きく異なる。例えば懸濁状態で培養する場合には、その支持体の大きさは $100\mu\text{m} \sim 5\text{mm}$ であることが好ましく、比重はゆるやかな攪拌又は上方向への培養液の環流によって疑似浮遊状態を維持するために $1.00 \sim 1.30\text{g}/\text{cm}^3$ であることが好ましい。また支持体内部に培

養液が流通し、かつ細胞が内部まで侵入し付着するためには、多孔体の細孔の大きさは20～500 μm で、かつ連通孔構造であることが好ましい。かかる担体は細胞毒性のない素材であり、担体に蛋白質が吸着しないことが必要である。更に担体は堅くないこと、光学的に透明であること及びS/V値(単位体積当りの表面積)ができるだけ大きいことが好ましい。

一方、担体を固定床として用いる場合、多孔体の細孔の大きさは20 μm ～5 μm であることが好ましい。なお固定床の場合、多孔体は堅くても問題にはならない。

本発明において好適に使用される重合性モノマーとしては、(メタ)アクリル酸エステル及び(メタ)アクリルアミドが挙げられる。具体的には、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ジエチレングリコール(メタ)アクリレート、トリエチレングリコール(メタ)アクリレート、オクタエチレングリコール(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコール(メタ)アクリレート、

リレート、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、グリセロールジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、エチレンビス(メタ)アクリルアミド、トリエチレンビス(メタ)アクリルアミド等が挙げられる。

架橋性成分は、支持体の構成成分の漏出等を最小限に抑えるために使用することが好ましいが、架橋性成分の含有率が高すぎると血清中の蛋白質及び細胞によって分泌された生理活性蛋白質が吸着され、効率的に回収できないという問題点が生じる。従って、架橋性成分の含有率は0～90重量%、更には、1～50重量%であることが好ましい。

本発明においては、上記のモノマー成分に対し希釈剤を添加することが好ましい。これによりモノマーが支持体に対して内部まで均一に含浸されたり、均一にコーティングされ、生成した高分子に適度の可撓性を持たせ、多孔性高分子を安価に製造することができる。

メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、グリセロール(メタ)アクリレート、2,3-ジヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート、(メタ)アクリルアミド、メチル(メタ)アクリルアミド、エチル(メタ)アクリルアミド、グリシジル(メタ)アクリレート等が挙げられる。

上記の中から適宜選択される重合性モノマー成分に、必要に応じて架橋性成分を添加することも本発明においては好ましい態様の一つである。すなわち、支持体表面を被覆する高分子が水不溶性であれば架橋性成分は必須成分ではないが、該高分子からの可溶性成分及び支持体の構成成分等の溶出の防止や、細胞培養担体としての力学的強度の点から、架橋性成分を添加することが望ましい。

かかる架橋性成分としては、前述のモノマー成分と共重合体を有し、親水性の強い多官能ビニルモノマーが好適である。

例えば、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、

モノマー成分に添加される希釈剤としては、モノマーを溶解し、モノマー成分の官能基、すなわちメタクリロイル基、水酸基、グリシジル基、アミド基等や支持体に対し不活性、もしくはそれらの機能を失わないものであることが必要である。しかし一般に好適な希釈剤は、使用されるモノマー種によって大きく異なるが、通常ベンゼン、トルエン、メチルイソブチルケトン、酢酸エチル、酢酸ブチル、1-ヘキサノール、シクロヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、シクロヘキサノン、ジブチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、エタノール、2-プロパノール、メタノール、アセトン、水等が好適である。更に上記の有機溶媒中、水と混合し得る溶媒については水と混合して使用することも可能である。

一般に、水不溶性高分子は、細胞と高分子との接触点を多くするために光学的に透明な非多孔質

であることが好ましいが、多孔質高分子であっても差しつかえない。そして、モノマーに対し、希釈剤として良溶媒を添加した場合には、被覆する水不溶性高分子は、光学的に透明な高分子となり、貧溶媒を用いた場合には光学的に不透明な多孔質高分子となる。また同一溶媒を用いた場合でも、より親水性のモノマーを使用した場合には、得られる高分子は、光学的に透明な非多孔質な高分子を生成しやすい。

本発明において、全モノマー成分に対する希釈剤の添加量は0～10倍量であることが好ましく、特に好ましくは、1.0～5.0倍量である。希釈剤を過剰に添加した場合には機械的強度が維持できなかったり、重合収率が低下する等の問題が生じる。

本発明において正に荷電し得る官能基が培養液中において、0.50～2.50 meq/gのイオン交換容量を有し、かつ支持体表面において正に荷電し得る構成モノマー単位のCLOGP値が、-2.0～+2.0の範囲にある細胞担体が細胞を高率で付着

させ、良好に伸展増殖させることができる。なお、CLOGPとは溶質の水-1-オクタノール系における分配係数を計算によって求めるものであり、これにより分子の疎水性を定量的に表現するものである。

上記の正に荷電し得る官能基のイオン交換容量は、細胞、官能基種、細胞によって分泌される蛋白質、細胞培養支持体等により異なる。この値が低いと一般に細胞の付着性が悪くなり、値が高くなると付着率は良好となるが、上記の範囲を越えると再び細胞の付着率が悪化したり、付着しても細胞の伸展性、増殖性が悪くなる傾向が観察される。

細胞の付着性、増殖性に影響を与えるのは、官能基の量ばかりではなく、支持体表面において正に荷電し得る構成モノマー単位のCLOGP値によっても大きく影響される。

本発明の細胞培養担体上の正に荷電し得る官能基は、培養液中においてその一部は解離状態にあると考えられるが、Wei-Shou Huら(バイオテク

ノロジー アンド バイオエンジニアリング

(Biotechnology and Bioengineering), 29, 1155-1163, 1987, 図6-図8)は、pH 7.20における増殖速度に及ぼす正味の荷電量の影響は、少ないか又は全く規則性がないことを報告している。従って、支持体表面において正に荷電し得る構成モノマー単位の疎水性度は、中性分子における非解離状態のCLOGP値のみを考慮すれば良い。本発明者らは、相当する構成モノマー単位のCLOGP値が-2.0より低い場合、得られる水不溶性高分子に対する細胞の付着性が悪くなり、逆にこのCLOGP値が+2.0より大きくなると、疎水性阻害により細胞の伸展性、増殖性が悪くなるばかりでなく、細胞によって分泌された生理活性蛋白質を吸着することを見い出した。また、更に該構成モノマー単位の量と構成モノマー単位のCLOGP値との間には規則性が観察され、細胞を培養担体に良好に付着、増殖させるためには、そのCLOGP値が低い場合には構成モノマー単位の量を多くし、そのCLOGP値が高い場合には該構成モノマー単位の量を低く

することが好ましいことも見い出した。

CLOGP値が-2.0～+2.0の範囲にあり、正に荷電し得る官能基を有する構成モノマー単位としては、例えば表-1及び表-2に示したものを挙げることができるが、本発明の要旨を越えない限り、表中の化合物に限られるものではない。なお、表中においてMeはメチル基を、Etはエチル基を表わす。

また、本発明における支持体表面上で正に荷電し得る構成モノマー単位のCLOGP値は、米国、カリフォルニア州のボモナ大学で開発されたCLOGPシステム((Ver 3.33 Mar. 1985, PACOM Ver 2.0 May 1988) by T.Nishioka(京都大学))により求めた。



表 - 1

(メタ) アクリルアミド類	CLOGP (R=H)	CLOGP (R=Me)
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	-1.013	-0.508
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array} \end{array}$	-0.215	0.290
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Et} \\ \text{Et} \end{array} \end{array}$	-0.683	1.188
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array} \end{array}$	-0.920	-0.611

表 - 1 続き

$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Et} \\ \text{Et} \end{array} \end{array}$	-0.022	0.287
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array} \end{array}$	0.529	0.838
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array} \end{array}$	-1.991	-1.701

表 - 2

(メタ) アクリル酸エステル類	CLOGP (R=H)	CLOGP (R=Me)
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array} \end{array}$	0.814	1.123
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array} \end{array}$	0.470	0.779
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Et} \\ \text{Et} \end{array} \end{array}$	1.712	1.981
$\begin{array}{c} \text{R O} \\ \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Et} \\ \text{Et} \end{array} \end{array}$	1.368	1.677

表 - 2 続き

$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	-0.810	-0.510
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{Et} \\ \text{Et} \end{array} \end{array}$	0.807	1.116
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$	-0.978	-0.669
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$	-1.434	-1.125
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{OH} \end{array}$	-0.905	-0.596

表 - 2 続き


$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \quad \text{Me} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$	- 0.6 3 6	- 0.3 2 7
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \quad \text{Et} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array}$	- 0.1 8 7	0.1 2 2
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \quad \text{---} \end{array} \text{N} - \text{H} \end{array}$	- 0.3 5 3	- 0.0 4 4
$\begin{array}{c} \text{R O} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} \end{array}$ 	1.3 6 3	1.6 7 4

表 1-2 続き

$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{OH} \\ \parallel \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2 \end{array}$	- 0.9 0 4	- 0.5 9 5
$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{OH} \\ \parallel \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2 \end{array}$	- 1.3 3 4	- 1.0 7 5
$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{OH} \\ \parallel \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_6 - \text{NH}_2 \end{array}$	- 0.8 0 5	- 0.4 9 6
$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{OH} \\ \parallel \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_8 - \text{NH}_2 \end{array}$	0.2 5 3	0.5 6 2
$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{OH} \\ \parallel \quad \\ \text{CH}_2 = \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_9 - \text{NH}_2 \end{array}$	0.0 6 6	0.3 7 5

支持体表面の少なくとも一部を水不溶性高分子で被覆する方法は、以下の方法に従って行うことができる。

例えば、布、紙、ろ紙、セラミック、多孔性担体等の表面を被覆する場合、まずモノマー類、架橋剤類及び希釈剤を混合してなるモノマー溶液に重合開始剤を添加する。この溶液を上記担体に含まし、過剰のモノマー溶液を除去後、窒素雰囲気下で支持体を加温し、モノマーを重合させる。プラスチックシャーレ、ガラスシャーレ等の場合は、モノマー溶液を支持体表面に張り、窒素雰囲気下で加温すると支持体表面を水不溶性高分子で被覆することができる。ローラー・ボトル等の場合は、モノマー溶液をローラー・ボトル内に入れ、窒素雰囲気下にする。1~20 rpm でローラー・ボトルを回転させながら加温し、モノマーを重合させる。

灌流用培養担体の一つの製造法としては、カラム内に、例えば多孔性セラミックス等を充填した後、重合性モノマー溶液を流し、含浸させる。

その後過剰のモノマー溶液を除去し、窒素雰囲気下でカラムを加熱することにより、水不溶性高分子で被覆した担体を得ることができる。

本発明で使用する重合開始剤としては、例えば以下のものを挙げることができる。

すなわち、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウロイル、過酸化アセチル等の過酸化物系重合開始剤；アゾビスイソバレロニトリル、2,2'-アゾビス-2,4-ジメチルバレロニトリル、2,2'-アゾビス-2-シクロプロピルプロピオニトリル等のアゾ系重合開始剤；2,2'-アゾビス(2-(5-メチル-2-イミダズリン-2-イル)プロパン)ジヒドロクロリド、2,2'-アゾビス(2-メチル-N-フェニルプロピオンアミジン)ジヒドロクロリド等の水溶性アゾ系重合開始剤；過酸化水素水- Fe^{2+} 塩、過硫酸塩- NaHSO_3 、過酸化ベンゾイル-ジメチルアニリン、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム-N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン等のレドックス系重合開始剤；トリエチルホウ素、ジエチル亜鉛等の極低温用重

合開始剤；更に紫外線照射や、 γ 線照射により重合を開始させることもできる。

ここで重合開始剤の選択は、モノマー類、架橋剤類、有機希釈剤等の種類によって大きく異なる。これらの混合溶液が水溶性である場合は、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム-N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン等のレドックス系重合開始剤又は水溶性アゾ系重合開始剤が用いられる。またこれらの混合溶液が水に難溶性か又は不溶性の場合は、過酸化物系重合開始剤、アゾ系重合開始剤が好ましく使用される。

前述の重合開始剤を用いる場合、重合系内は窒素雰囲気下で重合を行うことが好ましい。重合温度は、用いる重合開始剤により大きく異なり、一般にレドックス系重合開始剤では、0℃～室温又は50℃以下で行うことができるが、アゾ系重合開始剤及び過酸化物系重合開始剤の場合は、50～100℃で行わなければならない。

モノマー単位が正に荷電し得る官能基を有する場合、得られた高分子は、そのまま用いることが

できる。しかし高分子が上記荷電し得る官能基を全く有さないか又は不十分な量しか有さない場合は、正に荷電し得る官能基又は蛋白質を当該高分子に化学結合させなければならない。例えば、高分子中のグリシジル基はアミン化合物との反応により、アミド基の場合には1級アミンを有するジアミンとの反応により、容易に化学修飾することができる。水酸基、2,3-ジヒドロキシプロピル基等の場合には、臭化シアンの反応によりイミドカルボネートを得た後、ジアミンとの反応により化学修飾することができる。又同様にトリクロロトリアジンを反応させ、生成したジクロロトリアジル基とジアミンとの反応によっても化学修飾することができる。

担体に導入された正に荷電し得る量は、支持体によっては測定することは難しい場合が多い。その場合、別個にガラスシャーレ上にモノマーをコーティングした後ポリマーを回収し、正に荷電し得る荷電量を滴定によって推定することはできる。なお、本発明の実施例に示した正の荷電量は、上

記の方法によって推定により求めた値である。

上述の末端官能基を用いて、蛋白質、ポリペプチド等も同様に反応させて化学結合させることができる。この反応様式に関しては、モスバックによるメリッツ・イン・エンザイモロジー、134、136、137巻等に詳細に記述されている。

例えば、エポキシ基を用いて蛋白質を導入する場合には、pH 9.0～12.0のリン酸緩衝溶液、ホウ酸緩衝溶液、炭酸緩衝溶液等の溶液中で、室温ないし37℃で攪拌することにより容易に化学修飾することができる。

グルタルアルデヒドで化学修飾する場合には、まず1, ω -アルカンジアミンを用いてエポキシ基に末端アミノ基を有するスパーサー基を導入した後、グルタルアルデヒドで末端アミノ基と蛋白質表面の塩基性アミノ酸残基を反応させ、導入することができる。末端アミノ基の他に、2,3-ジヒドロキシプロピル基とも同様に反応することができる。すなわち、2,3-ジヒドロキシプロピル基と臭化シアンの反応によって生成するイミド

カルボネートを用いて、塩基性緩衝溶液中において蛋白質との反応により化学修飾することができる。

本発明の細胞培養担体を用いて培養する方法としては、支持体、培養の目的によっても大きく異なるが、例えば以下の方法が挙げられる。

シャーレ、T-フラスコの場合は静置培養、スピンナー・フラスコ、ローラー・ボトルの場合は懸濁培養、固定床として用いる場合には灌流培養法により培養することができる。

本発明によれば、多くの支持体を細胞培養担体とすることができ、実験室から商業的生産規模まで同一培養環境下で培養することができる。これによって有用な生理活性物質、例えば蛋白質医薬品、モノクローナル抗体、ワクチン、ウイルス等が効率的に生産することができる。

(発明の効果)

本発明による培養担体を構成する重合性モノマーは、液体であるため、種々の物質に含浸させる又はコーティングさせる等により、支持体の表面

を水不溶性の高分子で被覆することができる。この被覆は、既に正に荷電し得る官能基を含有する場合もあれば、被覆後に正に荷電し得る官能基又は蛋白質を化学修飾することもできる。この方法により、実験室段階でのシャーレ培養、ローラー・ボトル培養から大量培養スケールまで、ほぼ同一培養環境で培養を達成することができる。

また従来知られていた以外の種々の支持体に含浸コーティングすることができるので、細胞の代謝、分化、組織培養を研究する上でも有用である。

(実施例)

以下、実施例により、本発明を詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り、以下の実施例によって限定されるものではない。

(実施例-1)

ジエチレングリコールメタクリレート 7.00 g、ジメチルアミノエチルメタクリレート 2.50 g (CLOGP 値 1.123)、グリセロールジメタクリレート 0.50 g、1-ペンタノール 2.20 g 及び重合開始剤 2,2'-アゾビス (2,4-ジメトキシ

ノール 2.00 g 及び V-65 50 mg の混合溶液を調製した。

室温で窒素ガスを通じ、溶存酸素を除去した。

多孔性セラミック担体 (ブリヂストン社製セラミックフォーム #40、平均細孔径 300 μm) 10 ml に上記モノマー溶液の一部を滴下した。

以下、実施例-1 と同様の操作を行い、ポリマーの担持量が 3.9 重量% である細胞培養担体を得た。推定される官能基量は、約 1.2 meq/g である。

(実施例-3)

ジメチルアミノプロピルメタクリルアミド (CLOGP 値 -0.611) 2.75 g、メタクリルアミド 9.0 g、メチレンビスアクリルアミド 1.0 g 及び 20% メタノール水溶液 30 g を加え、室温で窒素ガスを通じ、溶存酸素を除去した。更にこの中へ過硫酸アンモニウム 20 mg を添加し、溶解した。

セルロース製のろ紙に上記モノマー溶液を含浸し、過剰のモノマー溶液は除去した。これをガラス管内に入れ、この中をテトラメチルエチレンジ

バレロニトリル (V-65、和光純薬工業製) 20 mg を混合した。室温で窒素ガスを通じ、溶存酸素を除去してモノマー溶液を得た。

多孔性セラミック担体 (ブリヂストン社製セラミックフォーム #30、平均細孔径 500 μm) 10 ml に上記モノマー溶液の一部を滴下した。含浸後過剰のモノマー溶液を除去し、窒素ガスで置換したガラス容器内に入れ、70℃ に加温した。窒素ガスを通じながら 3 時間加温重合させた後に多孔性セラミック担体を取り出し、1-ペンタノール及び残留モノマーを除去するため、50% アセトン水溶液で洗浄した。最後に水で充分水洗し、細胞培養試験に供した。該ポリマーの担持量は、4.2 重量% であった。推定される官能基量は、約 1.3 meq/g である。

(実施例-2)

ノナエチレングリコールメタクリレート 7.00 g、ジエチルアミノプロピルメタクリレート (CLOGP 値 1.677) 2.50 g、ノナエチレングリコールジメタクリレート 0.50 g、1-ヘキサ

アミンの窒素気流を通じ、重合を行った。

2 時間反応を行った後、セルロース紙を取り出し、残存モノマーを水洗して除去した。この担体を細胞培養試験に供した。該ポリマーの担持量は、6.9 重量% であった。推定される官能基量は約 1.2 meq/g である。

(実施例-4)

実施例-2 で用いたモノマー溶液を用いて、以下に示すようなコーティングを行った。

ガラス製シャーレ (60 mm ϕ) に上記モノマー溶液 1.5 ml を滴下し、表面に薄く溶液を張った。窒素雰囲気下で 65℃ に加温し、ガラス製シャーレをポリマーでコーティングした。重合終了後、ポリマーを 50% エタノール水溶液で洗浄した。最後に水で充分水洗し、残存モノマーを除去した。

該ポリマーの担持量は、8.2 重量% であった。推定される官能基量は、約 1.2 meq/g である。

(実施例-5)

テトラエチレングリコールメタクリレート 7.0 g、グリンジルメタクリレート 2.5 g、テトラエ

チレングリコールジメタクリレート0.50g、1-ヘキサノール15.0g及び塩化メチレン0.1mlに溶解した2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)(V-70、和光純薬工業特製)20mgを添加し、モノマー溶液を調製した。室温で窒素ガスを通じ、溶存酸素を除去した。

多孔性セラミック担体(ブリヂストン社製セラミックフォーム#40)10mlに上記モノマー溶液の一部を滴下した。含浸後過剰のモノマー溶液を除去し、窒素ガスで置換したガラス容器内に入れ、50℃に加温した。重合反応中も窒素ガスを通じた。2時間重合反応を行った後、多孔性セラミック担体を取り出し、1-ペンタノール及び残留モノマーを除去するため、50%アセトン水溶液で洗浄した。最後に水で充分水洗した。

上記担体をアミノ化するため、セラミック担体を1,4-ジオキサンで洗浄し置換した。1,4-ジオキサンで浸した担体10mlにエタノールアミン0.50gを滴下し、50℃で4時間アミノ化反

応を行った。アミノ化反応終了後、担体を取り出し、水で充分水洗した。この担体を細胞培養試験に供した。

該ポリマーの担持量は、5.6重量%であった。

かかるアミノ化処理により、正に荷電し得る構成モノマー単位は、メタクリル酸-2-ヒドロキシ-ヒドロキシエチルアミノプロピルであり、そのCLOGP値は、-0.669である。

推定される官能基量は、約1.5meq/gである。

(実施例-6)

ジエチレングリコールメタクリレート6.0g、グリシジルメタクリレート3.0g、グリセロールジメタクリレート1.0g、1-ヘキサノール18.0g及び塩化メチレン0.1mlに溶解したV-7020mgを添加し、モノマー溶液を調製した。室温で窒素ガスを通じ、溶存酸素を除去した。

多孔性ポリウレタンフォーム(ブリヂストン社製)10mlに上記モノマー溶液の一部を滴下した。含浸後過剰のモノマー溶液を除去し、窒素ガスで置換したガラス容器内に入れ、50℃に加温

した。重合反応中も窒素ガスを通じた。2時間重合反応を行った後、多孔性ポリウレタンフォームを取り出した。残留モノマー、オリゴマー及び1-ヘキサノールを除去するため50%アセトン水溶液で洗浄した。最後に水で洗浄した。

上記のコーティングしたポリウレタンフォームをアミノ化するため、エタノールで洗浄して置換した。この溶液中に4-アミノ-1-ブタノール0.50gを滴下し、60℃で4時間アミノ化反応を行った。反応終了後、ポリウレタンフォームを50%エタノールで洗浄した。更に水洗した後、リン酸緩衝溶液pH7.40で洗浄し、細胞培養に供した。該ポリマーの担持量は、6.3重量%であった。

かかるアミノ化処理により、正に荷電し得る構成モノマー単位は、メタクリル酸-2-ヒドロキシ-4-ヒドロキシブチルアミノプロピルであり、そのCLOGP値は、-0.596である。推定される官能基量は約1.9meq/gである。

(実施例-7)

実施例-5でコーティングした担体を用いて、蛋白質の修飾反応を行った。まずコーティング担体を50mMリン酸緩衝液(pH9.5)で充分洗浄した。一方で、0.5%ゼラチン(シグマ社製)のリン酸緩衝溶液pH9.5を調製した。

次に、上記担体10mlにゼラチン溶液0.5mlを滴下し、50℃で5時間振とうし、ゼラチンを化学修飾した。反応終了後、リン酸緩衝溶液(pH7.4)で洗浄した。この担体を細胞培養担体に供した。

(実施例-8)

ステンレス製カラム(内径20mm×長さ10cm)にセラミックフォーム(ブリヂストン社製#40)の切片を充填した。

2-ヒドロキシアクリレート6.00g、ジエチルアミノエチルメタクリレート(CLOGP値1.981)3.20g、トリエチレングリコールメタクリレート0.80g、酢酸ブチル及び塩化メチレン0.1mlに溶解したV-7020mgを添加し、モノマー溶液を調製した。室温で窒素ガスを通じ溶存酸素

を除去した。

上記のステンレス製カラム内に、窒素雰囲気下でモノマー溶液を流し込んだ。過剰のモノマーを除去したのち、窒素雰囲気下でカラムを50℃の水浴中に2時間浸し、重合反応を行った。重合終了後、50%アセトン水溶液で洗浄した。更に水で洗浄した。該ポリマーの担持量は、3.1重量%であった。推定される官能基量は約1.7 meq/gである。

(細胞培養実験)

実施例1, 2, 3, 5, 6及び7で製造された細胞培養用担体を用いて細胞培養実験を行った。

それぞれの細胞培養用担体を蒸留水で充分洗浄した後PBS(-)溶液で洗浄し、更にダルベッコイグ変性培地(高圧蒸気滅菌可能)で2回洗浄置換した。これらの担体を121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。細胞培養は、e-RDF培地(極東製薬社)、MEM又はDMEM+HamF12(1:1)の混合培地に10%牛胎児血清(三菱化成製)を加えて培養を行った。

細胞培養実験に供した細胞は表-3に示す通りである。

表 - 3

細胞	細胞系	由来	形態	培地
WATC細胞 (ATCC CCL-81)	アフリカミドリザル	腎	線維芽状	e-RDF
COS-1細胞 (ATCC CRL-1650)	"	"	"	DMEM + Ham F12
CPK細胞	ブタ	"	"	e-RDF
8HK-21細胞 (ATCC CCL-10)	シリアンハムスター	"	"	"
CHO-K1細胞 (ATCC CCL-21)	チャイニーズハムスター	子宮 卵巣	"	"
DeR細胞 (ATCC CCL-16)	"	肺	"	DMEM + Ham F12
MRC-5細胞 (ATCC CCL-171)	ヒト 胎児	"	"	MEM
HeLa細胞 (ATCC CCL-2)	ヒト	子宮 頸部	上皮性	e-RDF
MDCK細胞 (ATCC CCL-34)	イヌスニエル (コックスニエル)	腎	"	"
NIH/3T3細胞 (ATCC CCL-1658)	マウス	結合組織	線維芽状	MEM

12穴プレートを用いて培養実験を行った。各々のウェル内に0.2~0.3 mlの細胞培養担体切片を入れ、10%血清含有培養液1.0 mlを加えた。37℃に設定した炭酸インキュベータ内で培養を開始した。

各実施例の細胞培養結果(3日間培養後の増殖性)を、表-4に示す。

表 - 4

細胞名	実施例-1	実施例-2	実施例-3	実施例-5	実施例-6	実施例-7
Vero	++	++	+	++	++	+
COS-1	++	++	+	++	++	+
CPK	++	++	+	++	++	+
BHK-21	++	++	++	++	++	++
CHO-K1	++	++	++	++	++	++
Don	++	++	+	++	++	+
MRC-5	+	+	+	++	++	+
HeLa	++	++	++	++	++	+
MDCK	++	++	++	++	++	++
NIH/3T3	+	+	+	++	++	+

++: 非常に良好, ++: 良好, +: あまり良くない